

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

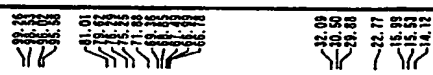
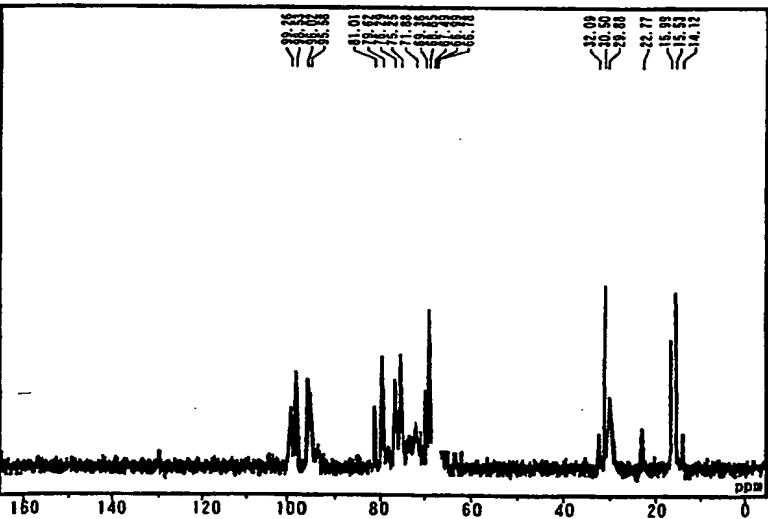
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



<p>(51) 国際特許分類6 C07H 15/04, 1/00, C08B 37/00, A61K 31/70, 31/715</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/10360</p> <p>(43) 国際公開日 1999年3月4日(04.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03703</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月21日(21.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/240298 1997年8月22日(22.08.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA)[JP/JP] 〒105-0021 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 長岡正人(NAGAOKA, Masato)[JP/JP] 柴田英之(SHIBATA, Hideyuki)[JP/JP] 木村逸子(KIMURA, Itsuko)[JP/JP] 橋本秀介(HASHIMOTO, Shusuke)[JP/JP] 〒105-0021 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社 ヤクルト本社内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 佐藤正年, 外(SATO, Masatoshi et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目21番19号 秀和第2虎ノ門ビル 三和国际特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: OLIGOSACCHARIDE DERIVATIVES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 オリゴ糖誘導体とその製造法</p> <p>(57) Abstract Oligosaccharide derivatives which have higher homogeneity and more excellent antiulcerous effects than those of fucose and rhamnose polysaccharides and are represented by the following general formula: $Y-OCH(CH_2NHR)_2$, wherein Y represents an oligofucose or oligorhamnose having a degree of polymerization of 2 to 20 in which part of the hydroxy groups may have been sulfated; R represents phenyl, higher alkylphenyl, higher alkyl, or $-(CH_2)_n-NHX$, where n is an integer of 1 to 10; and X represents higher alkanoyl or alkylamino.</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1;">  </div> <div style="flex: 2;">  </div> </div>		

(57)要約

フコースやラムノース多糖類より均一性が高く、またより優れた抗潰瘍効果を有する次の一般式で表されるオリゴ糖誘導体。



式中、Yは重合数2～20のオリゴフコース又はオリゴラムノースで、一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。また、Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ であり、nは1～10の整数、Xは高級アルカノイル基、またはアルキルアミノ基を示す。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TC	ターゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明 細 書

オリゴ糖誘導体とその製造法

技術分野

本発明は、オリゴ糖誘導体とその製造法に関し、特別には、胃及び十二指腸などの消化器粘膜における炎症や潰瘍の発生予防及び治療に有効なオリゴフコース又はオリゴラムノース誘導体に関するものである。

背景技術

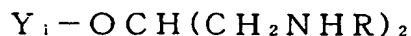
従来から用いられている抗潰瘍剤としては、胃酸分泌抑制を目的としたH₂-プロッターやプロトンポンプ阻害剤が知られている。また、胃炎や胃粘膜細胞の積極的な治療を目的として、近年ではプロスタグランジンや塩基性繊維芽細胞増殖因子などの利用も検討されている。これら薬剤は、一方では有効な治療効果を示すが、他方では潰瘍の発症、特に特定の菌、ヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)が関与するその再発を招く恐れがあり、消化性潰瘍の根本的な治療には本菌の除菌を含めた治療が必要であることが指摘されている(浅香正博、" *Helicobacter pylori*と胃粘膜病変"、先端医学社、1995年7月1日)。

ある種のビフィズス菌や乳酸菌、及びモズクや青海苔などから調製される多糖類やオリゴ糖類は、潰瘍の予防のみならず治癒促進にも有効であり、抗潰瘍剤として使用可能なことも知られている(特開平6-247861号公報、特開平7-138166号公報)。これらの多糖類やオリゴ糖類はフコースやラムノースを主成分とする。なかでもフコースのポリマーであるフコイタンは、潰瘍形成に対する予防効果や治癒促進効果のみならず、ヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*)に対する接着阻害作用も有している。しかしながら、これら多糖やオリゴ糖そのものは、抗潰瘍活性の点で満足すべきものでなく、また分子量などの均一性も得にくい。

本発明の主な目的は、上記多糖類より均一性が高く、また、より優れた抗潰瘍効果を有するオリゴ糖誘導体とその製造法を提供することである。

発明の開示

本発明に係るオリゴ糖誘導体は、次の一般式で表される。



ここで、 Y_1 は重合数2～20のオリゴフコースで、その一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。また、Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ であり、nは1～10の整数、Xは高級アルカノイル基、またはアルキルアミノ基を示す。この場合、アルキルアミノ基は置換基を有してもよい。

本発明に係る別のオリゴ糖誘導体は、次の一般式で表される。



ここで、 Y_2 は重合数2～20のオリゴラムノースで、その一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。また、Rはフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ であり、nは1～10の整数、Xは高級アルカノイル基、またはアルキルアミノ基を示す。この場合、アルキルアミノ基は置換基を有してもよい。

これらオリゴ糖誘導体は、優れた抗潰瘍効果などの諸性質を有している。

また、本発明に係るオリゴ糖誘導体の製造法は、オリゴフコース又はオリゴラムノースの還元末端の糖残基を酸化分解によりアルデヒド基に変換する工程と、該アルデヒド基に、対応するアルキルアミン、アリルアミン類の少なくとも一つを作用させてシッフ塩基を生成させる工程と、

該シッフ塩基を還元する工程とを備えたものである。

即ち、フコイダン（フコース多糖）やラムナン（ラムノース多糖）を、酸処理などにより、オリゴ糖（フコース又はラムノースの3～20程度のオリゴマー）とし、さらに、過ヨウ素酸酸化、対応するアミン類との反応、及び還元処理により、オリゴ糖誘導体を製造する方法である。

本発明によれば、ヘリコバクター・ピロリ菌用抑制剤が提供され、この薬剤は本発明によるオリゴ糖誘導体の1種又は2種以上、即ち、オリゴフコース誘導体及び／又はオリゴラムノース誘導体を含むものである。

また、本発明によれば、消化器潰瘍予防・治療剤も提供され、この薬剤は本発明によるオリゴ糖誘導体の1種又は2種以上、即ち、オリゴフコース誘導体及び／又はオリゴラムノース誘導体を含むものである。

本発明によるオリゴ糖誘導体の製造法の一つの実施形態は次のステップ1～8

を含む。

ステップ1： フコイダンやラムナンもしくはラムナン硫酸を含有する海藻類（モズク、クロメ、ヒバマタ、青海苔等）より、多糖を公知の抽出方法にて抽出する。

ステップ2： 得られた多糖類を0.075N～0.1N程度の塩酸もしくはトリフルオロ酢酸の溶液に溶解し100℃、10分～20分、加熱処理し多糖をオリゴ糖化する。処理後、水酸化ナトリウムにて中和し、本液に NaBH_4 を加え室温もしくは4℃にて16時間還元処理を行う。

ステップ3： ステップ2の操作により得られたオリゴ糖のアルジトール体の溶液を透析（分画分子量500）もしくは電気透析やイオン交換樹脂を用いて脱塩する。

ステップ4： ステップ3で得られた溶液にメタ過ヨウ素酸ナトリウムを加え氷温下で1時間程度反応させる。尚、構造的に還元末端及び非還元末端以外の糖鎖が酸化されないようなオリゴ糖、例えば1→3結合のオリゴ糖などの場合はさらに長時間反応しても良い。反応液に過ヨウ素酸に対し過剰量のエチレングリコールを加え、更に1時間程度反応する。本液をステップ3と同様の方法で脱塩する。この操作により、末端にアルデヒド基を有するオリゴ糖誘導体（液体）が得られる。

ステップ5： ステップ4で得られた液に0.5M濃度となるように酢酸を加え、室温下で20時間反応させる。反応液を分画分子量500の透析膜にて透析し、内液を凍結乾燥し目的とするオリゴ糖を得る。またオリゴ糖画分は透析による脱塩以外にも、活性炭カラムクロマトグラフィーやゲル濾過等を用いて任意の分子量サイズの画分を脱塩も兼ねて調製してもよい。

ステップ6： ステップ5で得られたオリゴ糖画分を40～50%のプロパノールを含む水溶液に溶解しアリルアミン、アルキルアミン類を加え45℃にて2時間反応し、シッフ塩基を形成させる。この場合、用いる溶媒はオリゴ糖及びアルキルアミンを溶解しうる物質（ジメチルスルフォキシド、ジメチルホルムアミドなど）であればよい。この場合、反応させるアルキルアミン類、アリルアミン類としては、その選択にとくに制限はないが、置換、非置換のアニリン類、置換、非置換の高級アルキルアミン類、が好ましく、この場合、置換基としては、アルキル基、

アルカノイルアミノ基、アルキルアミノ基、などが挙げられる。

ステップ7： ステップ6で得た液にボラントリメチルアミンを加え、45℃にて20時間シッフ塩基を還元する。還元剤としてはボラントリメチルアミン以外にも、本目的に合致するような還元剤（例えば、ボランジメチルアミン、 NaCNBH_3 、 NaBH_4 など）が、適宜利用できる。

ステップ8： ステップ7の還元反応終了後、溶媒をエバポレーター等で留去し、次いでクロロホルム：メタノール：水＝2：1：1の混液で分配し、水層を集める。水層をクロロホルムで洗浄後、凍結乾燥することにより、オリゴ糖アルキルアミン複合体からなるオリゴ糖誘導体を得る。分配抽出に用いる溶媒は、アルキルアミンの性質により適宜変更してもよい。

本発明によるオリゴ糖誘導体は、消化器潰瘍の原因菌であるヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) 菌の定着阻害効果、及び酢酸誘発潰瘍の治療効果を有することが確認されている。

本発明によって得られる消化器潰瘍予防・治療剤の剤形や投与量は任意に選定することができる。しかしながら、一般的には、本剤を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、崩壊剤、結合剤、崩壊剤、潤沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等に製剤して使用するのが適当である。また本剤の成人1日当たりの好適投与量は、約 0.1mg/kg以上10mg/kg以下、好ましくは0.3mg/kg以上3mg/kg以下である。

図面の簡単な説明

図1はオリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)のNMRスペクトル(^{13}C -NMR)図である。

図2はオリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)のIRスペクトル図である。

図3は酢酸誘発潰瘍の操作を示す工程図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1. オリゴフコース誘導体の製造

(1-1) フコイダンの抽出及びフコースオリゴ糖の製造

沖縄モズク (*Cladosiphon okamuranus Tokida*) を脱イオン水にて塩抜きを行った後、藻体1kg当たり1リットルの割合で脱イオン水に懸濁し、本懸濁液を塩酸でpH 2とした。本液を100℃、10分加熱抽出後、ガーゼにて藻体を濾別し、濾液をさらに遠心し不溶物を除いた(9000rpm, 60分)。

得られた上清をNaOHにて中和後、0.2M濃度になるようにメタ過ヨウ素酸ナトリウムを加え、混入してくるアルギン酸を分解し、遮光下にて20時間反応後、エチレングリコールにて反応を停止した。本液に水素化ホウ素ナトリウムを0.2M濃度になるように加え室温にて16時間、反応した。本液を限外濾過(分画分子量 5,000)にて濃縮後、透析した。透析内液を塩酸にてpH 2とし 100℃、10分加熱処理した。処理液を透析後、凍結乾燥しフコイダンを得た(4g/1kg湿藻体)。

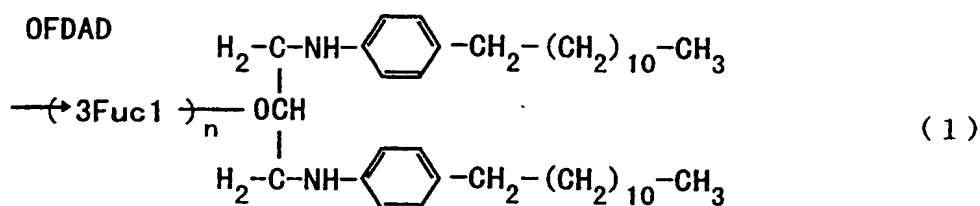
このフコイダンを200mg/mlの濃度に溶解し、0.075M~0.1M濃度となるように塩酸(若しくはトリフルオロ酢酸)を加えた。100℃にて10分、加熱後、室温まで冷却した。本液をNaOHにて中和後、NaBH₄をフコイダン1gにつき200mgの割合で加え、4℃にて20時間反応させた。反応液を酢酸にてpH 6とし、電気透析装置(旭化成、マイクロアシライザー、AC220膜使用)にて脱塩した。脱塩後、試料溶液に0.2M濃度となるようにNaIO₄を加え、氷温下にて1時間反応させた。反応液にエチレングリコールを過ヨウ素酸に対し2当量加え、氷温下にてさらに1時間反応させた。反応液を分画分子量500の透析膜(スペクトラム社製)にて透析し、透析内液を凍結乾燥しオリゴ糖標品を得た(平均分子量約1000~3000、又は平均重合度8~14)。

(1-2) フコースオリゴ糖の過ヨウ素酸酸化

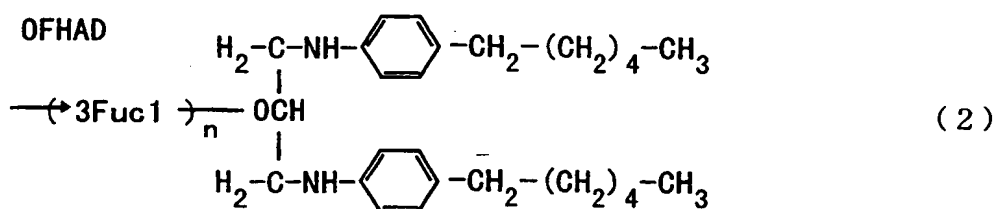
フコースオリゴ糖の溶液(2%、100ml)に0.2M濃度となるようにNaIO₄を加え、氷温下にて1時間反応させた。この反応液にエチレングリコールを当量加え、氷温下にてさらに1時間反応させた。得られた反応液を500ml容量の活性炭カラム(和光純薬製、クロマトグラフィー用活性炭)に添加し、3リットルの水で非吸着物を溶出した。本カラムに3リットルの35%、エタノール水を加え、吸着画分を回収した。この画分をエバポレーターにて濃縮し、オリゴ糖のアルデヒド型誘導体を得た(収率約25%)。

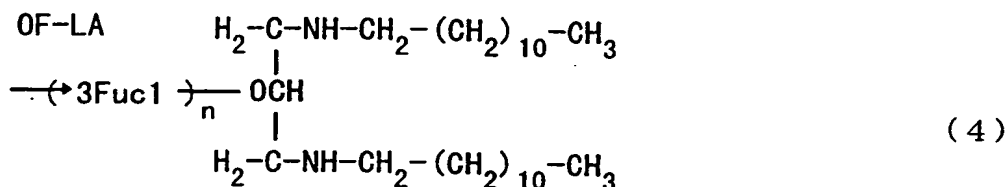
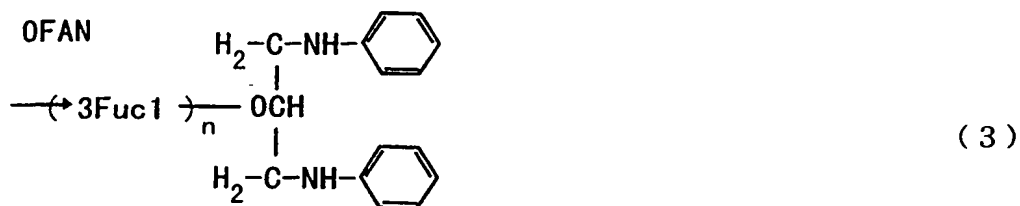
(1-3) アミン類との反応及び還元反応

(1-2)で製造したオリゴ糖のアルデヒド誘導体を50%のn-プロパノール水に50mg/mlの割合で溶解し、10mg/mlの割合でドデシルアニリンを加える。45℃にて2時間反応後、ボランジメチルアミン複合体を10mg/mlとなるように加える。45℃にて20時間反応し、反応液を減圧乾固する。残渣をクロロホルム：メタノール：水＝2：1：1の混液を加え分配する。水層を集め、水層にクロロホルムを等量加え、分配洗浄を行う。この操作を2回繰り返した後、水層を凍結乾燥し、オリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)を得た(収率約64%)。本物質の構造は、メチル化分析及びNMR等の解析結果より以下の(1)式のように決定された。なお、フコース残基の4位の水酸基の一部は硫酸エステル化されている。図1はオリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)のNMRスペクトル(^{13}C -NMR)図であり、図2はオリゴフコースドデシルアニリン誘導体(OFDAD)のIRスペクトル図である。



(1-3)と同様に、ドデシルアニリンの代わりに、ヘキシルアニリン、アニリン、もしくはラウリルアミンなどのアルキルアミンと反応させ、反応液を同様に分配し、(2)式のオリゴフコースヘキシルアニリン誘導体(OFHAD)、(3)式のオリゴフコースアニリン誘導体(OFAN)、(4)式のオリゴフコースラウリルアミンアミン誘導体(OF-LA)等のオリゴフコース誘導体を得た。





実施例 2. オリゴラムノース誘導体の製造

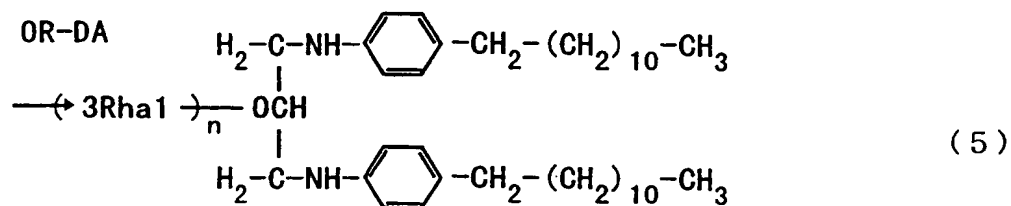
(2-1) ラムノースオリゴ糖の製造

青海苔（ヒロハヒトエ草）の乾燥藻体を10倍量の水に懸濁させ、100℃に2時間加熱してラムナン硫酸を浸出させた。遠心分離して固形物を除いた後、エタノールを添加し、沈殿した多糖類を集めて水に溶解し、透析により低分子量成分を除いて内液にラムナン硫酸を得た。次いで、ラムナン硫酸を含有する内液に濃度が0.01規定になるように塩酸を添加して100℃に加熱し、脱硫酸反応を生じさせた。その後、再度透析を行い、内液にラムナンを得た。

このラムナンを前述のフコイダンの場合と同様の方法で弱酸分解、還元、過ヨウ素酸酸化を同様に行いオリゴ糖アルデヒド型誘導体を調製した（平均分子量約1000～1500）。

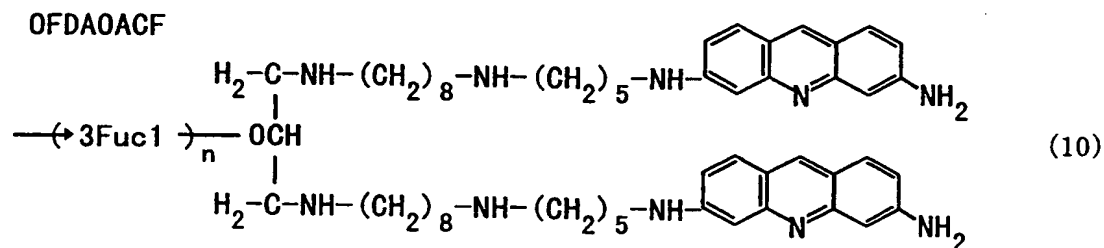
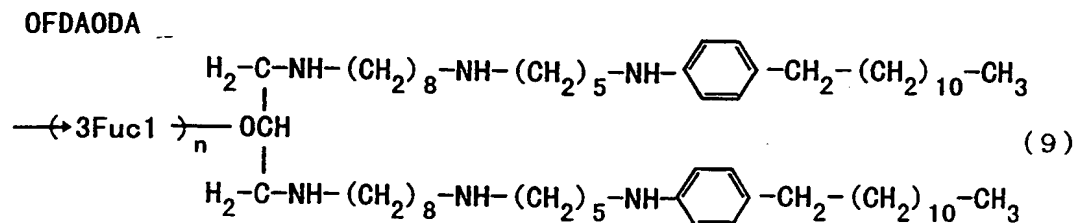
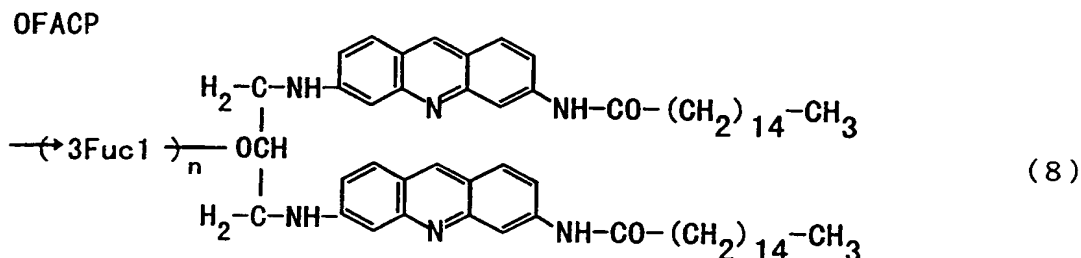
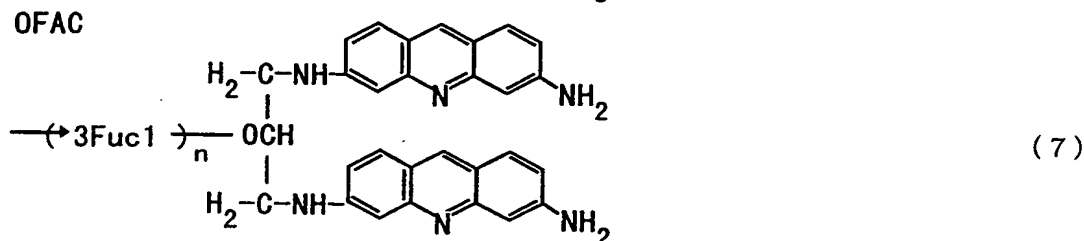
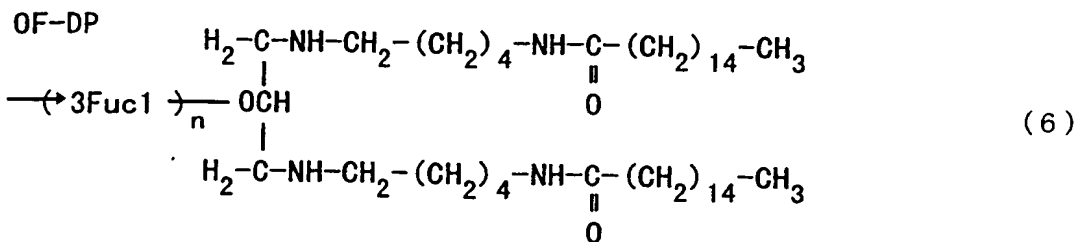
(2-2) アミン誘導体との反応

本画分とドデシルアニリンを前述と同様の操作により結合させ、(5)式のオリゴラムノースドデシルアニリン誘導体(OR-DA)を得た(収率約10%)。



以上に示した実施例 1, 2 で製造した (1) 式～(5) 式の誘導体以外にも、
前述の製造法により、作成した誘導体のリストを以下の (6) 式～(10) 式に示

す。



実施例 3. 抗潰瘍作用の検証 1

実施例 1 で得られたオリゴフコースドデシルアニリンについて、抗潰瘍作用を酢酸誘発潰瘍を用いて試験した。図 3 は酢酸誘発潰瘍の操作を示す工程図である。図 3 に示す通り、実験及び効果判定は、8 週齢の SD ラットに、1 日目に 20% 酢酸 30 μ l を胃体部に注入して、酢酸誘発潰瘍を発症させ、2 日目から 9 日目まで、1 ml 試料溶液を 1 日 1 回、経口的に投与した。なお、試験期間中、餌及び水は自由

摂取とした。

最終投与後にラットを絶食し、10日目に胃を摘出して、ホルマリン固定した後、潰瘍部分の短径と長径とを測定(Ulcer index)して、治癒率の評価を行った。評価は対照群に対し危険率 5%以下で効果を認めた場合に、有意とした。なお、治癒率(%)は $= (1 - \text{投与群の潰瘍の面積} / \text{対照群の潰瘍の面積}) \times 100$ で求めた。結果を次の表 1 に示す。

表 1

	Ulcer index (Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群 (11)	11.3 \pm 2.6	—
試料 0.1mg/rat/day x 8 (10)	6.2 \pm 1.5*	45.0
試料 0.5mg/rat/day x 8 (10)	8.2 \pm 4.7*	27.8
試料 1.0mg/rat/day x 8 (10)	6.7 \pm 2.9*	41.1

* ; 対照群に対しての危険率が5%以下。

実施例 4. 抗潰瘍作用の検証 2

試料溶液を実施例 1 で得られたオリゴフコースのアルキルアミン誘導体に代えて同様の抗潰瘍作用の検証を行った。具体的には、試料溶液として、オリゴフコースヘキシルアニリンと、オリゴフコースラウリルアミンとを用い、実施例 3 と同様の操作を行って、オリゴフコースヘキシルアニリン及びオリゴフコースラウリルアミンによる酢酸潰瘍に対する効果を検証した。結果を次の表 2 及び表 3 に示す。

表 2

	Ulcer index (Mea \pm SD)	治癒率 (%)
対照群 (10)	11.6 \pm 4.3	—
試料 0.1mg/rat/day x 8 (10)	7.5 \pm 2.8*	35.5
試料 0.3mg/rat/day x 8 (10)	8.4 \pm 3.8	27.5
試料 1.0mg/rat/day x 8 (10)	7.8 \pm 2.8*	33.5

* ; 対照群に対しての危険率が5%以下。

表 3

	Ulcer index (Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群	10.3 \pm 3.8	—
試料 0.5mg/rat/day x 8 (7)	5.1 \pm 2.1*	50.4
試料 2.0mg/rat/day x 8 (10)	7.2 \pm 3.6	30.3
試料 5.0mg/rat/day x 8 (10)	9.9 \pm 4.8	4.6

* ; 対照群に対しての危険率が5%以下。

実施例 5. 抗潰瘍作用の検証 3

オリゴフコースドデシルアニリンによるNSAIDS等により誘発される潰瘍に対する防御効果を検討するため、インドメタシン傷害に対する防御作用について効果検定を行った。

具体的な操作は、オリゴフコースドデシルアニリンを0.5%カルボキシメチルセルロース溶液 1 ml に溶解し、18時間絶食及び2時間絶水したラットに経口投与する。対照群にはカルボキシメチルセルロース溶液のみを投与する。試料投与2時間後に50mg/mlのインドメタシンを 1 ml 投与し胃粘膜傷害を惹起する。傷害惹起2時間後に麻酔下にて胃を摘出しホルマリン固定後、傷害部位（出血班）の長さと幅を測定し、その面積を求め、傷害形成の抑制率を求め、オリゴフコースドデシルアニリンによるインドメタシン胃傷害に対する予防効果を検証した。結果を次の表 4 に示す。

表 4

	Lesion index (mm ² , Mean \pm SD)	治癒率 (%)
対照群	46.06 \pm 24.72	—
試料 0.5mg/rat/day x 8 (7)	25.33 \pm 14.57*	45.0
試料 2.0mg/rat/day x 8 (10)	19.23 \pm 14.67*	58.2
試料 5.0mg/rat/day x 8 (10)	4.29 \pm 4.48*	90.7

* : 対照群に対しての危険率が5%以下。

実施例 6. ヘリコバクター・ピロリに対する接着阻害効果及び増殖阻害効果の検定

ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) は、消化性潰瘍の原因菌として近年注目さ

れてきた菌である。特に本菌に感染した患者においては、非常に高率で潰瘍の再発が認められ、また抗生物質等の大量投与により、本菌を除菌した患者では再発率が低下することから、消化性潰瘍の再発防止と言う点で本菌の除菌もしくは感染予防が重要視されてきている。事実、欧米では既に潰瘍の治療指針として本菌の除菌が指導されており、また日本においても加齢とともに感染率が増加していることから、今後潰瘍の治療薬にも本菌に対する効果が期待されてくるものと考えられる。

本菌の除菌には大量の抗生物質とプロトンポンプインヒビターの併用が有効な治療法であるが、耐性菌の問題などから、他の治療法の開発が必要と考えられている。本菌の感染に関しては、胃粘膜層から鞭毛運動により胃上皮細胞へ移行し、胃上皮細胞上のルイスb型 (Leb) 糖鎖のフコース残基を特異的に認識し定着するものと考えられている。本菌の接着においてはシアル酸、スルファチド、ラミニンなどの関与も報告されているが、胃上皮細胞そのものへの特異的接着と言う点では、フコースが重要な認識部位と考えられている。

特にモズク由来フコイダンには、抗潰瘍効果のみならずこの接着過程を阻害しうることが明らかとなっている。前述のオリゴ糖アルキルアミン誘導体においても *H. pylori* の接着を阻止できれば、本薬剤による潰瘍の治癒促進のみならず、本菌の感染予防及び再発防止を期待できるものと考えられることから、その接着阻害効果についても効果検定を行った。また、増殖阻害効果についても確認した。

具体的な操作は、P. W. Tangらの方法 (Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 132, 1985, p474-480) に従い、Leb型糖鎖の還元末端を還元し、この還元末端を過ヨウ素酸酸化したオリゴ糖を調製する。本オリゴ糖をジアミノヘキサンと結合させ、さらにアミノ基固定用マイクロプレート (コバリンクプレート、NUNC社製) に固定化する。本プレートにビオチン標識したヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) を加え、室温下で1時間反応させる。この時、オリゴフコースドデシルアニリン誘導体を適宜共存させる。反応液を緩衝液で洗い未結合の菌体を除く。

次いで、各ウェルにストレプトアビジン溶液 (50 $\mu\text{g/ml}$) を100 μl 加え、室温下で1時間反応する。これによりウェル中に残っていた菌体にストレプトアビジンが選択的に結合する。洗浄して過剰のストレプトアビジンを除き、次いでパー

オキシダーゼ標識したビオチン溶液 (2.5 $\mu\text{g/ml}$) を 100 μl 加える。室温下で 30 分、反応させた後、過剰の酵素標識ビオチンを除く。本操作によりビオチン化された菌体を選択的に酵素標識ビオチンが結合し、この酵素活性を基質溶液 (KPL 社製、ABTS パーオキシダーゼ基質システム) 100 μl を加え、10 分反応させることにより検出した。検出は波長 405nm の吸光度を測定することにより行った。測定される吸光度は Leb 型糖鎖を認識して結合した菌体量を示すことから、オリゴフコースドデシルアニリン誘導体の添加による吸光度の減少率により、その定着阻害率がわかる。

上記試験においてオリゴフコースドデシルアニリン誘導体を 10~1000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で共存させると、次の表 5 のオリゴフコースドデシルアニリンによる *H. pylori* の Leb 型糖鎖への定着阻害活性の結果に示すように添加量の増加に伴い、吸光度が減少することから、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) と Leb 型糖鎖の結合がオリゴフコースドデシルアニリン誘導体により阻害されたことがわかる。

表 5

試料濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	吸光度 (405nm)
0	1.015
10	0.855
100	0.486
1000	0.080

次に、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) に対する増殖阻害効果を検定するため、オリゴフコースのドデシルアニリンを用いた。0.1% の β サイクロデキストリンを含むブルセラ培地で培養した臨床分離株である *H. pylori* 6-34 (1.5×10^8 CFU/ml) 100 μl を同培地 1 ml に懸濁し、試料 (オリゴフコースドデシルアニリン) 溶液、10 μl を加え、72 時間培養した。効果の判定は対照群の菌液の濁度 (OD 600 nm) に対する試料液の濁度より次式を用いて増殖抑制率を求め判定した。その結果、71.8% の増殖抑制率が得られた。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = (1 - \text{試料液の濁度} / \text{対照群の濁度}) \times 100$$

上述のように、本発明によれば潰瘍治癒促進作用とヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) の定着阻害作用を有し、潰瘍や胃癌に移行する胃粘膜の炎症の予防と治療に有用な薬剤が提供される。特に上述した物質は非常に低用量で消化性潰瘍に対する治癒促進効果や粘膜傷害に対する防御効果を示し、またオリゴ糖化により多糖に比べ物性及び活性において均一な物質を容易に調製できることから、薬剤としての利用も容易に行える点でも優れている。

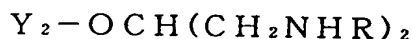
請求の範囲

1. 次の一般式で表されるオリゴ糖誘導体。



式中、 Y_1 は重合数2～20のオリゴフコースで、その一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。また、 R はフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ であり、 n は1～10の整数、 X は高級アルカノイル基、またはアルキルアミノ基を示す。

2. 次の一般式で表されるオリゴ糖誘導体。

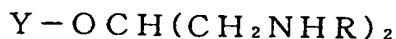


式中、 Y_2 は重合数2～20のオリゴラムノースで、その一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。また、 R はフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ であり、 n は1～10の整数、 X は高級アルカノイル基、またはアルキルアミノ基を示す。

3. 次の一般式で表されるオリゴ糖誘導体を製造するための方法であって、オリゴフコース又はオリゴラムノースの還元末端の糖残基を酸化分解によりアルデヒド基とする工程と、

該アルデヒド基に、対応するアルキルアミン、アリルアミン類の少なくとも一つを作用させてシッフ塩基を生成させる工程と、

該シッフ塩基を還元する工程とを備えたことを特徴とするオリゴ糖誘導体の製造法。



式中、 Y は重合数2～20のオリゴフコース又はオリゴラムノースで、その一部の水酸基は硫酸エステル化されていてもよい。また、 R はフェニル基、高級アルキルフェニル基、高級アルキル基、又は $-(CH_2)_n-NHX$ であり、 n は1～10の整数、 X は高級アルカノイル基、またはアルキルアミノ基を示す。

4. 請求項1記載のオリゴ糖誘導体の1種又は2種以上を含むことを特徴とす

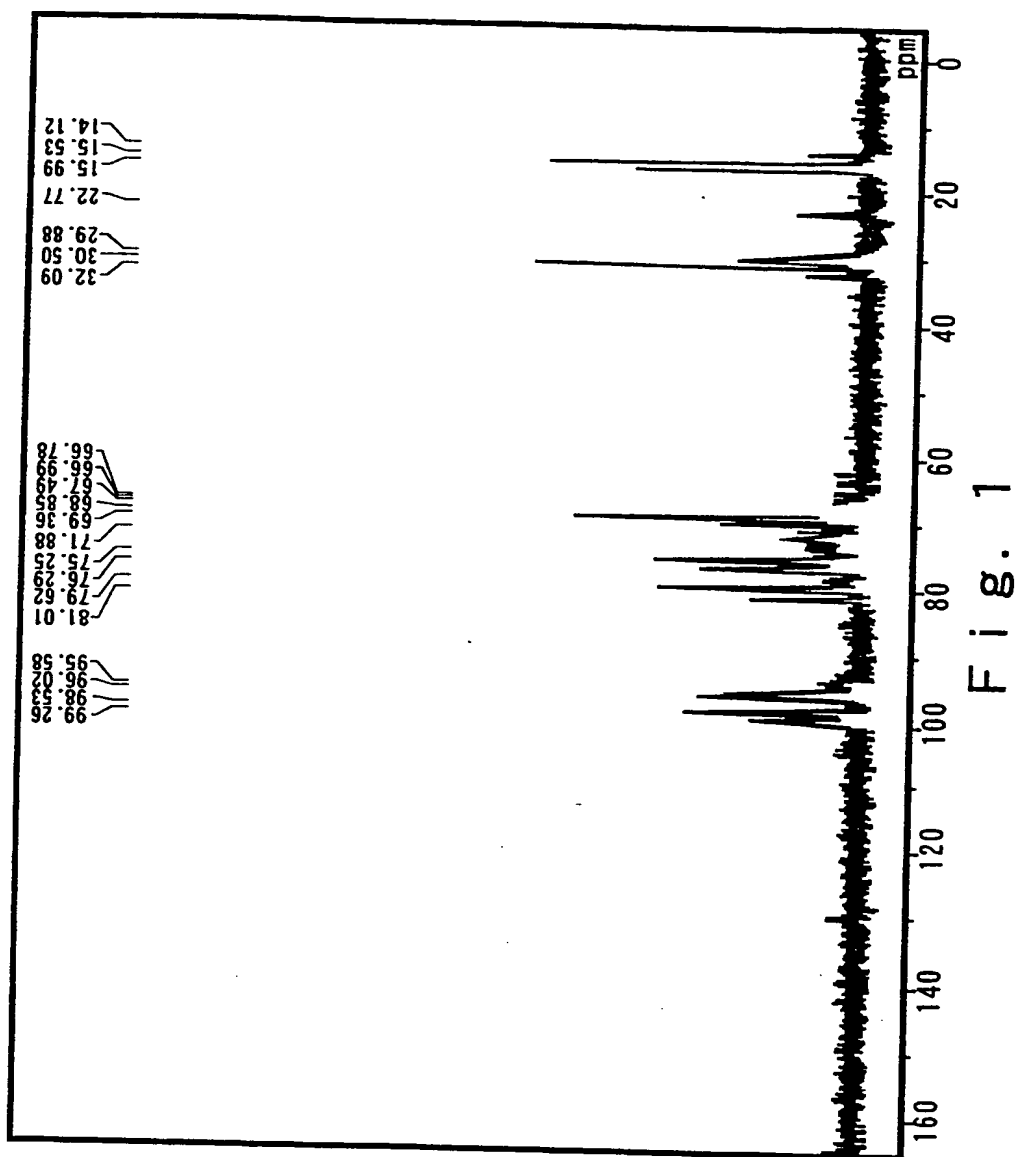
るヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 菌用抑制剤。

5. 請求項 2 記載のオリゴ糖誘導体の 1 種又は 2 種以上を含むことを特徴とするヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 菌用抑制剤。

6. 請求項 1 記載のオリゴ糖誘導体の 1 種又は 2 種以上を含むことを特徴とする消化器潰瘍予防・治療剤。

7. 請求項 2 記載のオリゴ糖誘導体の 1 種又は 2 種以上を含むことを特徴とする消化器潰瘍予防・治療剤。

1/3



2/3

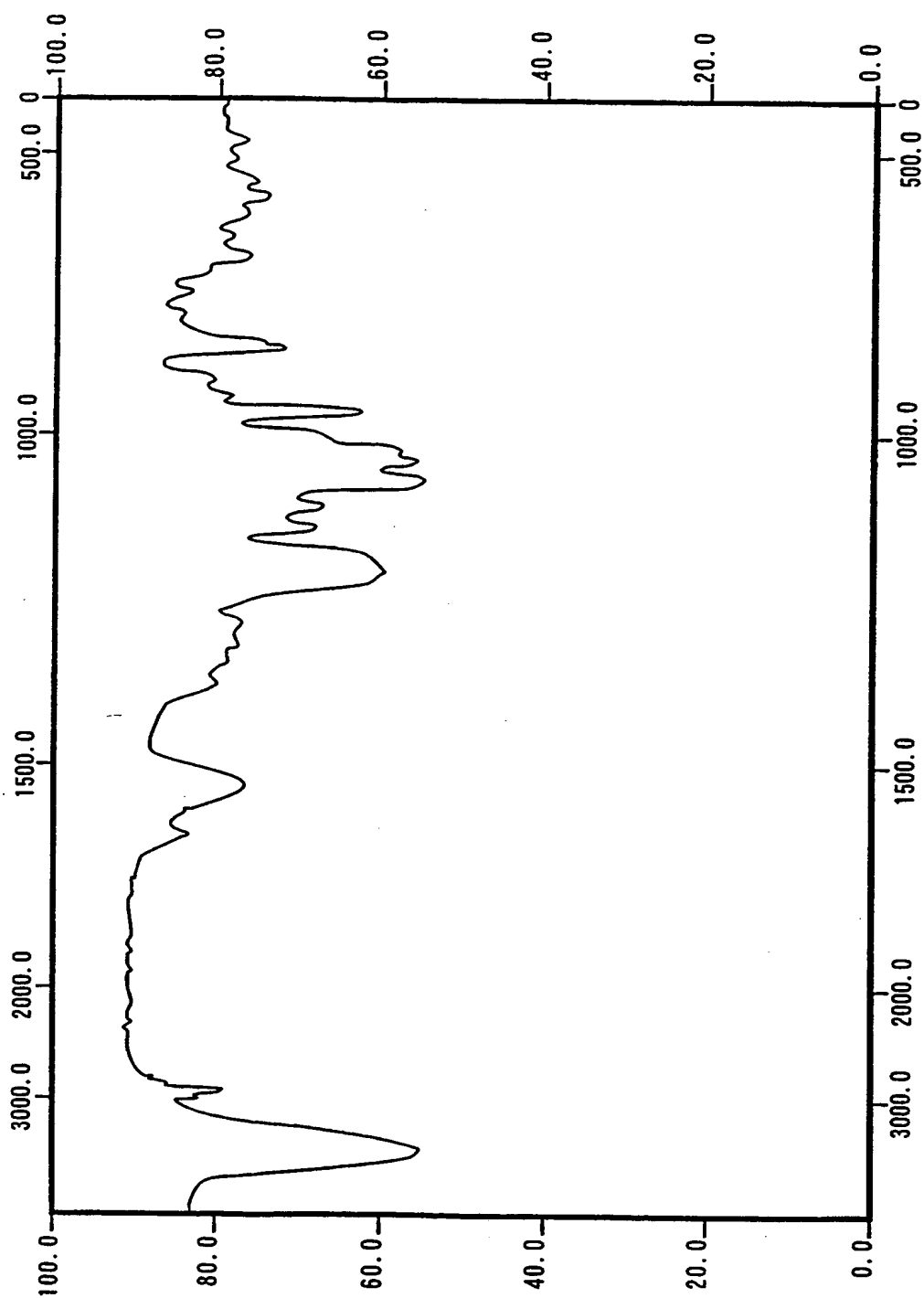
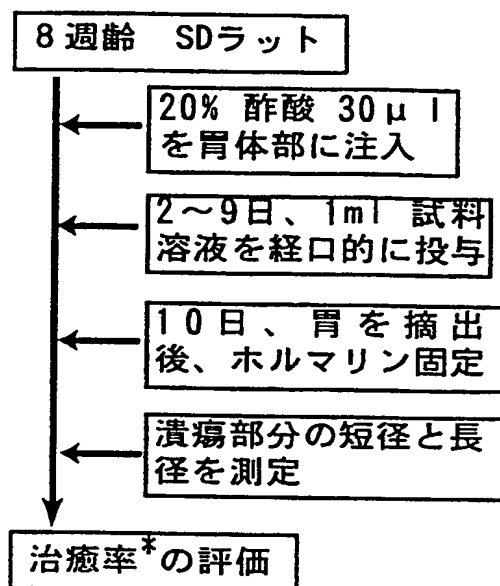


Fig. 2

3/3



F i g . 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/03703

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07H15/04, C07H1/00, C08B37/00, A61K31/70, A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07H15/04, C07H1/00, C08B37/00, A61K31/70, A61K31/715

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-138166, A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 30 May, 1995 (30. 05. 95) & EP, 645143, A1 & AU, 9474187, A & CA, 2132150, A & NZ, 264517, A & CN, 1108572, A	1, 3, 4, 6
A	JP, 6-247861, A (Yakult Honsha Co., Ltd.), 6 September, 1994 (06. 09. 94) & EP, 612527, A1 & AU, 9456408, A & NO, 9400634, A & CA, 2116516, A & FI, 9400908, A & NZ, 250968, A & US, 5698534, A	2, 3, 5, 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
2 November, 1998 (02. 11. 98)

Date of mailing of the international search report
10 November, 1998 (10. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03703

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl^o C07H 15/04, C07H 1/00, C08B 37/00, A61K 31/70,
A61K 31/715

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl^o C07H 15/04, C07H 1/00, C08B 37/00, A61K 31/70,
A61K 31/715

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-138166, A (株式会社ヤクルト本社) 30. 5月. 1995 (30. 05. 95) & EP, 645143, A1 & AU, 9474187, A & CA, 2132150, A & NZ, 264517, A & CN, 1108572, A	1, 3, 4, 6
A	JP, 6-247861, A (株式会社ヤクルト本社) 6. 9月. 1994 (06. 09. 94) & EP, 612527, A1 & AU, 9456408, A & NO, 9400634, A & CA, 2116516, A & FI, 9400908, A & NZ, 250968, A & US, 5698534, A	2, 3, 5, 7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

- 02. 11. 98

国際調査報告の発送日

10.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

印

4C

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3454